

ヒト腎組織における部位特異的ヘムオキシゲナーゼ-1 遺伝子発現の特徴とその臨床的意義

金沢大学大学院医学系研究科循環医学専攻血管発生発達病態学
(旧講座名：小児科学)
(主任：小泉晶一教授)

清水 正 樹

ヘムオキシゲナーゼ (heme oxygenase, HO)-1は、ヘム蛋白代謝における律速酵素で、種々の酸化ストレスにより誘導され、腎臓では尿細管上皮細胞における重要な細胞防御因子として注目されている。本研究では、種々の腎疾患におけるヒト腎組織での *in vivo* での HO-1 mRNA の発現様式を解析し、HO-1 蛋白発現や各種臨床データと比較しその臨床的意義について検討した。対象は、微小変換型ネフローゼ症候群9例、メサングウム増殖性糸球体腎炎63例 (IgA 腎症39例、紫斑病性腎炎21例、非IgA 腎症3例)、尿細管間質腎炎9例、急性尿細管壊死3例、巣状分節性糸球体硬化症3例、ループス腎炎4例、膜性増殖性糸球体腎炎3例、HO-1 欠損症1例とした。腎生検組織標本を用い *in situ* ハイブリダイゼーション法にて HO-1 mRNA の発現を検討した。HO-1 mRNA は、糸球体上皮細胞、ボウマン嚢上皮細胞、尿細管上皮細胞そして浸潤マクロファージに発現していた。尿細管上皮細胞では、近位側より遠位側で常に強く発現していた。近位尿細管では、HO-1 mRNA 発現と HO-1 蛋白発現に相関を認めた。一方、遠位尿細管では HO-1 蛋白発現が恒常的に強く認められたのに対して、HO-1 mRNA 発現レベルは症例により多様であり両者に相関は認められなかった。このような HO-1 mRNA 発現には疾患特異性は認めなかったが、その発現強度は近位・遠位尿細管上皮細胞、糸球体上皮細胞ともに、蛋白尿の程度と明らかな相関を認めた。これらの結果から、HO-1 は腎機能増悪因子である糸球体性蛋白尿から各種上皮細胞を保護するとともに、ネフロン生理的機能の保持にも貢献していることが示唆された。すなわち HO-1 は腎組織の各部位でそれぞれ特異的な機能を発揮することにより、腎機能の維持に重要な役割を担っている酵素であると考えられた。

Key words heme oxygenase-1, mRNA, *in situ* hybridization, oxidative stress, proteinuria

HO は、ヘムをビリベルジン、一酸化炭素、遊離鉄に分解する律速酵素である^{1)~3)}。これらの分解産物のうちビリベルジンはさらにビリベルジンリダクターゼにより抗酸化作用⁴⁾、抗補体活性⁵⁾をもつビリルビンとなる。一酸化炭素は cGMP を介して一酸化窒素にも似た血管拡張作用を示し、微小循環調節を担うとともに抗血小板凝集作用もあることが知られている^{6)~7)}。さらに産生された遊離鉄はフェリチンの産生を誘導し遊離鉄の除去とその再利用に働く^{8)~10)}。このように HO はヘムを分解することによって各種酸化ストレスから細胞を保護する方向に働き、生体防御の観点からみても非常に重要な酵素といえる。HO は、現在3つのアイソフォーム (HO-1, HO-2, HO-3) が知られ¹¹⁾、そのうち HO-1 は誘導型で、主として網内系細胞で産生され、過酸化水素、紫外線照射、熱ショック、重金属、低酸素、過酸素、エンドトキシン、サイトカインなど各種酸化ストレス下で誘導される^{12)~16)}。

Yachie ら¹⁷⁾は、ヒトでの世界初症例となる HO-1 欠損症例を経験しその臨床像を詳細に報告した。この症例では2歳時と5歳時に腎生検が施行され、さらに6歳時に頭蓋内出血を契機に死亡した際の剖検組織を合わせ、異なる3つの病期の腎組織に

ついて詳細な病理学的な検討がなされている。本症例における腎組織病変の特徴は、当初から認められていた糸球体における軽度のメサングウム増殖性変化は、全経過を通じて進行することがなかったのに対し、尿細管の拡張や萎縮、間質への細胞浸潤、線維化、尿細管閉塞に伴うボウマン嚢の拡張といった進行性の尿細管間質病変が大きな特徴であった¹⁸⁾。

Morimoto ら¹⁹⁾は、ヒト腎組織では、すべての腎疾患において HO-1 蛋白発現が尿細管上皮細胞でのみ認められ、糸球体内部では、一部に陽性細胞を認めるものの、すべて CD68 陽性のマクロファージであることを報告した。さらに他の動物モデルを用いた多くの検討でも、これまでに同様の結果が報告されており、尿細管上皮細胞が選択的に HO-1 蛋白を発現することが示唆されている^{20)~27)}。一方 *in vitro* の実験では、HO-1 は尿細管上皮細胞だけではなく、糸球体上皮細胞、メサングウム細胞、血管内皮細胞など様々な細胞で誘導されることが既に報告されている^{28)~31)}。これらの *in vivo* と *in vitro* の違いを明らかにするために、Yang ら³²⁾は培養ヒト尿細管上皮細胞と培養ヒトメサングウム細胞を用いて、酸化ストレスに対する両細胞の HO-1 産生能を比較し、細胞により HO-1 産生の誘導様式やストレス

平成16年11月20日受付、平成16年12月20日受理

Abbreviations : HO, heme oxygenase; PB, phosphate buffer; TBS, Tris-buffered saline; THP, Tamm-Horsfall protein

に対する反応が異なる事を報告した。

本研究では、種々の腎疾患におけるヒト腎組織での *in vivo* での HO-1 mRNA の発現様式を解析し、免疫染色による HO-1 蛋白発現や各種の臨床データと比較検討し、ヒト腎組織における HO 発現の特徴とその臨床的意義について検討した。

対象と方法

I. 対象および検体

1. 対象

金沢大学医学部附属病院小児科および共同研究機関である関連病院にて、治療管理がなされている種々の小児期腎臓疾患患者 95 名を対象とした。その内容は、微小変化型ネフローゼ症候群 9 例、メサングウム増殖性糸球体腎炎 63 例 (うち IgA 腎症 39 例、紫斑病性腎炎 21 例、非 IgA 腎症 3 例)、尿管間質腎炎 9 例、急性尿管壊死 3 例、巣状分節性糸球体硬化症 3 例、ループス腎炎 4 例、膜性増殖性糸球体腎炎 3 例であった。コントロールとして HO-1 欠損症例を対象に加えた。なお、全ての症例において本人あるいは保護者への説明と同意のうえ以下の検索を施行した。

腎組織診断は、腎生検組織の光学顕微鏡標本、電子顕微鏡標本、蛍光抗体法の所見により行なった。4 例において急性期に同年齢の正常対照値を超える血清クレアチニン値の上昇を認めた。その内容は、IgA 腎症の急性増悪 1 例、急性間質性腎炎 2 例、急性尿管壊死 1 例の計 4 例である。これらの 4 例はいずれも回復期には血清クレアチニン値は正常化した。微小変化型ネフローゼ症候群症例はいずれも頻回再発型あるいはステロイド依存性ネフローゼ症候群の症例で、腎生検は他の疾患との鑑別のため、あるいはシクロスポリンによる腎障害の評価のために施行した。微小変化型ネフローゼ症候群症例のうち 1 例のみシクロスポリン治療を受けていたが、他の 8 例はシクロスポリンやその他の免疫抑制剤の治療を受けていなかった。また、その微小変化型ネフローゼ症候群症例のうち 4 例は、腎生検時に蛋白尿は陰性で、他に薬物療法もを受けていなかった。その他の 5 例は高度の蛋白尿を認めていた。この薬物療法もを受けていな

く、かつ完全寛解中であった微小変化型ネフローゼ症候群 4 例の検体を正常コントロールとして用いた。各種腎疾患の罹病期間は数日から数年以上と様々であった。対象症例の臨床的な特徴について表 1 にまとめた。

2. 材料

各種腎疾患患者において診断および治療の評価目的に腎生検を行い腎生検組織を採取した。各々の腎組織標本について 4% ホルマリン溶液で固定した後にパラフィン包埋切片を作成した。

尿検体は、腎生検当日の起床時第 2 尿もしくは腎生検当日に比較的近い前後の外來尿を用いた。一般検尿は、新鮮尿にて、尿生化学検査などは、1500 回転、5 分間遠心した上清を測定検体とした。直ちに測定しない場合は、-80℃にて凍結保存し後日測定に用いた。

II. 方法

1. 尿検査

血尿および蛋白尿は、試験紙法 (エームス尿検査試験紙) (マイルス・三共株式会社、東京) で半定量した。微少血尿は、-、±、+、2+、3+ と、蛋白尿は、-、±、+、2+、3+、4+ と段階化した。なお、蛋白尿 “-” は、<10 mg/dl, “±” は、10 mg/dl 前後, “+” は、30 mg/dl 前後, “2+” は、100 mg/dl 前後, “3+” は、300 mg/dl 前後, “4+” は、1000 mg/dl 前後である。尿中 N-acetyl-β-D-glucosaminidase (NAG) (Noto 法), β2-ミクログロブリン (ラテックス免疫比濁法), クレアチニン値 (酵素法) は当院または関連病院の検査室で測定した。

2. 腎組織における HO-1 mRNA および HO-1 蛋白発現の検討

1) *In situ* ハイブリダイゼーション

i. RNA プロブの作成

HO-1 cDNA の翻訳領域を含む制限酵素認識部位 *XhoI-XbaI* 断片 (986 bp) をプラスミドにサブクローニングして RNA プロブを作製するために、HO-1 5' sense プライマー (5'-CTCCCCTCGAGCGTCCTC-3') および HO-1 3' antisense プライマー (5'-CCTTCAGTGCCACGGTAA-3') を用いて、正常ヒトリンパ球由来 cDNA から HO-1 cDNA を PCR 法で増幅した。PCR の条件は、1 サイクル 95℃ 30 秒, 55℃ 30 秒, 72℃ 90 秒と

Table 1. Characteristics of the enrolled patients

	Number of patients	Sex Male/female	Mean age years	Patients with elevated serum creatinine N
MCNS	9	7/2	6.9 ± 5.9	0/9
Mes-PGN	63	31/32	10.3 ± 4.4	1/63
IgA nephropathy	39	20/19	11.1 ± 4.2	1/39
Purpura nephritis	21	11/10	9.0 ± 4.7	0/21
Non-IgA nephropathy	3	0/3	10.0 ± 4.4	0/3
TIN	9	2/7	10.2 ± 5.4	2/9
ATN	3	2/1	12.3 ± 2.3	1/3
FSGS	3	2/1	6.0 ± 3.6	0/3
SLE	4	1/3	12.3 ± 2.2	0/4
MPGN	3	0/3	13.3 ± 4.2	0/3
HO-1 deficiency	1	1/0	—	0/1
Total	95	46/49	10.2 ± 4.6	4/95

ATN, acute tubular necrosis; FSGS, focal segmental glomerulosclerosis; HO-1 heme oxygenase-1; MCNS, minimal change nephrotic syndrome; Mes-PGN, mesangial proliferative glomerulonephritis; MPGN, membranous proliferative glomerulonephritis; SLE, systemic lupus erythematosus; TIN, tubulointerstitial nephritis.

して35サイクル行なった。PCR産物およびpGEM-11Zf (-) Vector (Promega Corporation, Madison, USA) をそれぞれ制限酵素 *Xho*I と *Xba*I で二重切断 (37℃, 2時間) 後, Quick Ligation Kit (New England Biolabs Inc, Beverly, USA) を用いて Ligation を行った。Ligation DNA を JM109 Competent cells (Promega) に導入し, 生じたコロニーからプラスミドを精製した。プラスミドに導入された HO-1 cDNA は, ABI Prism Dye Terminator sequencing kit (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Foster City, USA) を用いて塩基配列の確認を行った。Sense プローブの作成には *Xba*I で切断したプラスミドを, Antisense プローブの作成には *Xho*I で切断したプラスミドをテンプレートとして, Digoxigenin (DIG) RNA Labelling Kit (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) を用いて, DIG で標識された RNA プローブを作成した。

ii. ハイブリダイゼーション (hybridization)

腎組織パラフィン包埋切片を脱パラフィン, 脱アルコール処理を行い, 0.1M リン酸緩衝液 (phosphate buffer; PB) で, 30秒2回洗浄後, 4% パラホルアルデヒドに10分間浸漬して再固定を行い, 0.1M PB で30秒2回洗浄後, Proteinase K 溶液 (DAKO Corporation, Carpinteria, USA) (20 μ g/ml in 10 mM Tris-HCl pH8.0, 1 mM EDTA) に37℃で30分間浸漬した。再度4% パラホルアルデヒドに10分間浸漬して再固定を行い, 0.1M PB で30秒2回洗浄後, 0.2N HCl に10分間浸漬した。0.1M PB で30秒2回, 0.1M トリエタノールアミン-HCl (pH8.0) に2分間浸漬した後, 0.25% 無水酢酸を含む0.1M トリエタノールアミン-HCl に10分間浸漬した。4×SSC; 0.6mol/L sodium chloride, 0.06mol/L sodium citrate) に10分間2回浸漬後, 50% 脱イオン化ホルムアミド/1×SSC に50℃で60分間浸漬しプレハイブリダイゼーションを行った。85℃に加熱したハイブリダイゼーション溶液 (50% ホルムアミド, 10 mM Tris-HCl (pH7.6), 1 mM EDTA, 600 mM NaCl, 1×デンハルト液, 0.25% SDS, 10% デキストラン硫酸ナトリウム, 200 μ g/ml tRNA) で RNA プローブを100倍に希釈し, 十分混合後85℃で3分間加温し, プレハイブリダイゼーションを行った切片に滴下した。50% ホルムアミドで保湿したモイスチャーチャンバーの中で42℃で16時間ハイブリダイゼーションを行った。プローブの洗浄は50% 脱イオン化ホルムアミド/2×SSC に50℃で30分間, 50% 脱イオン化ホルムアミド/1×SSC に50℃で30分間浸漬して行った。DIG 緩衝液-1 (100 mM Tris-HCl pH7.5, 150 mM NaCl) に5分間浸漬した後, 5% スキムミルクでブロッキング処理を行った。DIG 緩衝液-1 で30倍に希釈したウサギ抗 DIG 抗体 (DAKO) を滴下し30分間抗原抗体反応を行った後, DIG 緩衝液-1 に15分間2回浸漬し洗浄した。次に DIG 緩衝液-2 (100 mM Tris-HCl pH9.5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂) に3分間浸漬してから NBT/BCIP 発色液 (DAKO) を滴下し, 37℃の暗所で2時間発色させた。反応停止溶液 (10 mM Tris-HCl pH7.6, 1 mM EDTA) に3分間浸漬し反応を停止後軽く水洗し, メチルグリーン溶液で核染色を行い観察した。

2) 免疫組織染色

腎組織パラフィン包埋切片を脱パラフィン, 脱アルコール処理を行い, トリスアミノメタン緩衝生理食塩水 (Tris-buffered saline, TBS) (pH7.2) にて5分, 3回洗浄した。その後抗原性の賦活化目的に10% Target-Retrieval 溶液 (DAKO) に各切片を浸漬し, 5分間マイクロウェーブ照射 (500W 電子レンジ) で加熱

処理を行った。加熱処理後, 沸騰した10% Target-Retrieval 溶液に浸漬したまま室温に30分間静置した後, TBS にて5分間3回洗浄した。4% 正常ヤギ血清 (DAKO) を加えたTBSで30分間ブロッキング処理後, 一次抗体と反応させた。HO-1 蛋白染色には200倍希釈のウサギ抗ヒト HO-1 ポリクローナル抗体 (Stressgen Biotechnologies, Victoria, Canada) を4℃で12時間反応させた。マクロファージ検出用としては, 加熱処理の前に0.5 mg/ml の Pronase (DAKO) による蛋白分解処理 (室温, 15分間) を追加した。一次抗体は, CD68 抗原に対して, 100倍希釈のマウス抗ヒトマクロファージ (抗CD68抗原) モノクローナル抗体 (DAKO) を4℃で12時間反応させた。遠位尿細管を区別するために用いた Tamm-Horsfall 蛋白 (Tamm-Horsfall protein, THP) 染色には, 100倍希釈のヒツジ抗 THP 抗体 (Chemicon Int. Inc., Temecula, USA) を4℃で12時間反応させた。それぞれの一次抗体反応後TBSにて5分間3回洗浄した。HO-1 蛋白染色およびCD68 抗原染色では, 二次抗体としてアルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗ウサギ・抗マウス血清 (ENVISION/AP ポリマー試薬, DAKO) を室温で30分間, THP 染色ではアルカリフォスファターゼ標識ロバ抗ヒツジ抗体 (Chemicon Int. Inc.) を室温で30分間反応させた。そしてTBSにて5分間3回洗浄後, 0.1M Tris-HCl 緩衝液 (pH8.6) 10 ml に Naphtol AS-MX phosphate (Sigma, St Louis, USA) 2 mg, シアゾジウム塩 (Fast-red TR salt, Sigma) 10 mg, レバミゾール (Levamisole) (Sigma) 2.4 mg をそれぞれ溶解したものを基質として用いて発色させた。発色後蒸留水内で反応を止め, Mayer ヘマトキシリン溶液にて核染色を試行し観察した。

3) HO-1 mRNA と HO-1 蛋白発現の定量的評価

HO-1 mRNA および HO-1 蛋白の発現強度は, 糸球体内, 近位尿細管, 遠位尿細管においてそれぞれ別々に評価した。近位尿細管と遠位尿細管の区別は, 近位尿細管は遠位尿細管より直径が大きいこと, 近位尿細管の核は細胞の基底側に偏在していること, 多くの近位尿細管細胞は明らかな刷子縁を有することなどを指標として判断したが, 尿細管間質障害の程度が強い症例では, HO-1 染色との連続切片を用いて遠位尿細管において特異的に発現する THP の免疫組織染色を施行して鑑別した。

HO-1 蛋白発現は, 既に報告済みであるように染色強度と分布から以下のようにポイント化を行い評価した¹⁹⁾。つまり, ポイント0; 染色なし, ポイント1; weak and focal, ポイント2; weak and diffuse または moderate and focal, ポイント3; moderate and diffuse または strong and focal, ポイント4; strong and diffuse と評価した。

HO-1 mRNA 発現は, 前述の HO-1 蛋白発現と同様に染色強度と分布から以下のようにポイント化を行い評価した (図1)。なお, HO-1 mRNA の染色強度は, 蛋白発現のように3段階 (weak, moderate, strong) に分ける事は困難であったので2段階評価とした。つまり, 尿細管では, 強さ (weak, strong) と分布 (focal, diffuse) をもとにポイント0; 染色なし, ポイント1; weak and focal, ポイント2; weak and diffuse または strong and focal, ポイント3; strong and diffuse と評価し, 糸球体では, 1つの糸球体内での分布 (segmental, global) と組織全体の分布 (focal, diffuse) をもとにポイント0; 染色なし, ポイント1; segmental and focal, ポイント2; global and focal または segmental and diffuse, ポイント3; global and diffuse と評価した。なお, 尿細管間質腎炎症例9例のうち, 2例で生検標本内

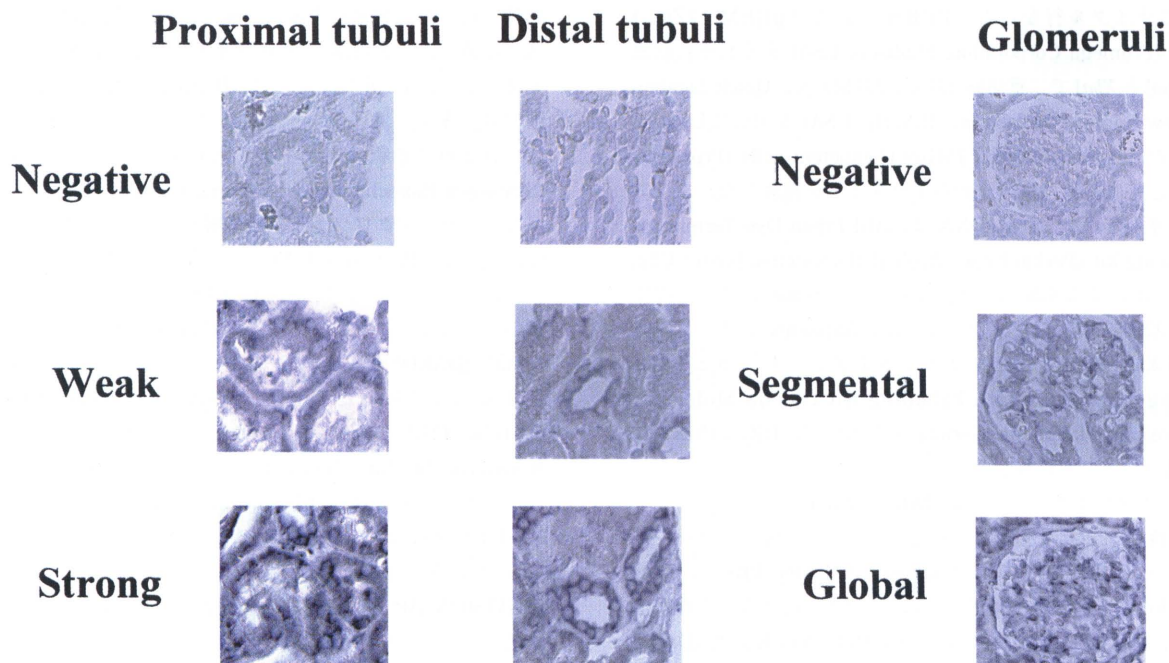


Fig. 1. Evaluation of the levels of heme oxygenase-1 (HO-1) mRNA expression. Intensity of HO-1 mRNA staining within glomeruli, proximal tubuli and distal tubuli was evaluated by in situ hybridization. Representative figures within proximal and distal tubuli for negative, weak and strong staining are shown at left. Representative figures within glomeruli for negative, segmental, global are shown at right. Negative controls are the kidney specimens from the HO-1 deficient case.

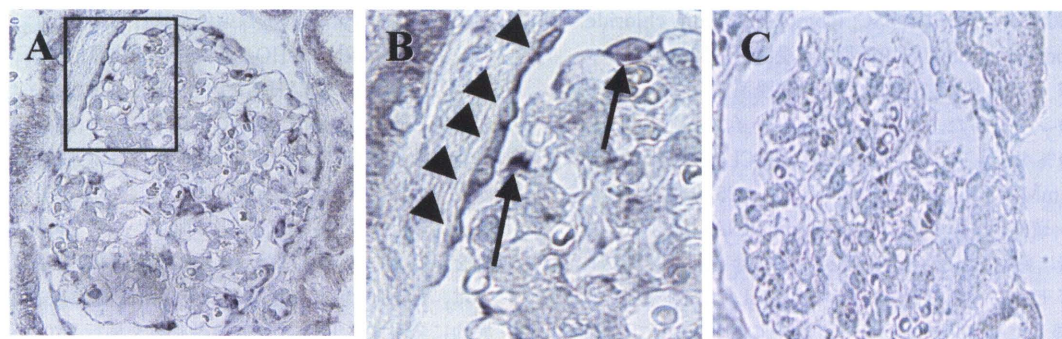


Fig. 2. Demonstration of HO-1 mRNA expression within glomeruli. HO-1 mRNA expression was detected within glomeruli (A) original magnification $\times 400$. A high-power view show that the cells expressing HO-1 mRNA within glomeruli are the glomerular epithelial cell (arrows) located at the periphery of the capillary wall and Bowman's epithelial cells (arrowheads) (B) original magnification $\times 1000$. No signal was detected with sense RNA probe (C) original magnification $\times 400$.

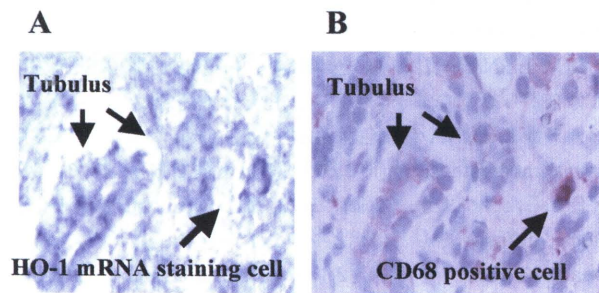


Fig. 3. HO-1 mRNA expression within interstitium and CD68-positive macrophages. HO-1 mRNA expression was detected within the interstitium (A) original magnification $\times 400$. Immunohistochemical examination of consecutive renal sections indicated that the cells expressing HO-1 mRNA within the interstitium were CD68-positive macrophages (B) consecutively, original magnification $\times 400$.

に糸球体が含まれておらず、更に異なる1例では、組織ダメージが強すぎて、近位尿細管の観察が不可能であった。よって、糸球体では7例、近位尿細管では8例の評価となった。

これらの定量的評価は、腎臓専門医数名 (3~5名) に依頼した。評価者は、患者情報が全くない状態で、もちろん患者名も隠した状態で評価していただいた。そして、各評価者の評価点を平均して最終的な定量的評価結果とした。

3. 統計処理法

測定値は平均値 \pm 標準偏差 ($\bar{X} \pm SD$) で表記した。有意差検定はMann-WhitneyのU検定およびFisherの直接確率計算法に行い、測定値間の相関性の有無はSpearmanの順位相関係数により検討した。 $p < 0.05$ を統計学的有意差ありと評価した。

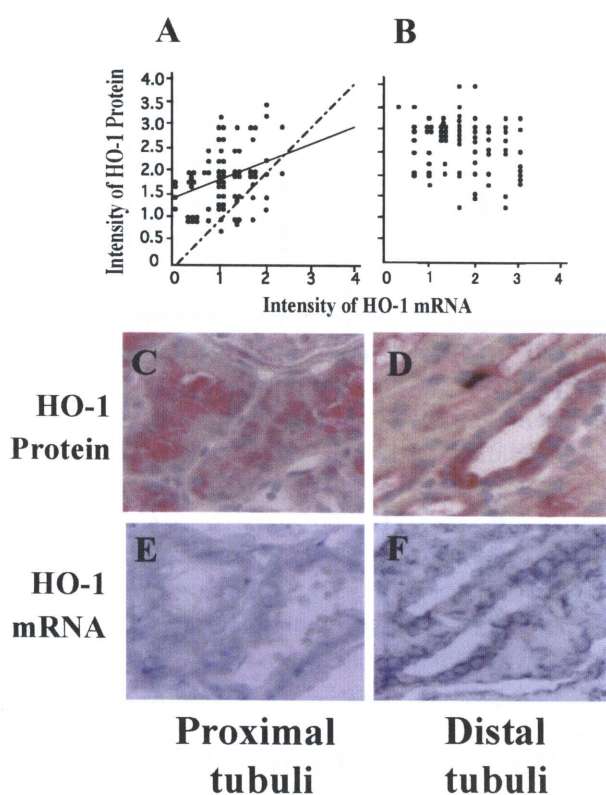


Fig. 4. Correlation between the levels of HO-1 mRNA expression and HO-1 protein expression. There was a significant correlation between the intensity of HO-1 mRNA expression and HO-1 protein expression within proximal tubuli (A) $R=0.31$, $Y=1.411+0.375X$, Spearman's correlation coefficient by rank, $P<0.05$. In contrast, there was no correlation between the intensities of HO-1 mRNA and HO-1 protein within distal tubuli (B). Both HO-1 mRNA expression and HO-1 protein expression tended to be more intense within distal tubuli than proximal tubuli. (C, D) HO-1 immunostaining, (E, F) HO-1 mRNA in situ hybridization.

成績

I. HO-1 蛋白のヒト腎臓内における発現の検討

以前報告した結果に、さらに症例数を増やし検討したが結果はほぼ同じものであった。つまり HO-1 蛋白は、いずれの疾患においても尿管上皮細胞においてのみ認められ、メサンギウム細胞、血管内皮細胞、糸球体上皮細胞などの糸球体内固有細胞には認めなかった。また HO-1 蛋白は、近位尿細管 (1.93 ± 0.69 ポイント) に比べ遠位尿細管 (2.65 ± 0.62 ポイント) のほうが有意に強く発現していた (Mann-Whitney 検定, $p<0.001$)。さらに、近位尿細管上皮細胞においてのみ、HO-1 蛋白の発現強度が蛋白尿の有無や血尿の程度に相関していた。一方、HO-1 蛋白発現に疾患特異的なパターンは認められなかった。

II. HO-1 mRNA のヒト腎臓内における発現の検討

陰性対照として用いた HO-1 欠損症例では、腎組織内には HO-1 mRNA 発現を認めなかった (図1)。腎固有細胞のうち、近位尿細管上皮細胞、遠位尿細管上皮細胞に HO-1 mRNA 発現を認め (図1)、その発現強度は、HO-1 蛋白発現と同様に近位尿細管上皮細胞 (1.02 ± 0.58 ポイント) より遠位尿細管上皮細胞 (1.76 ± 0.73 ポイント) の方が有意に高度であった (Mann-Whitney 検定, $p<0.001$)。さらに HO-1 蛋白の発現を認めなかった糸球体上皮細胞、ボーマン囊上皮細胞にも発現を認めた (図1, 図2A, B)。なお、HO-1 mRNA はメサンギウム細胞、糸球体血管内皮細胞には発現を認めなかった。Sense プローブでは発現は認めなかった (図2C)。腎固有細胞以外では、間質に浸潤するマクロファージ (CD68 陽性細胞) にも HO-1 mRNA 発現を認めた (図3)。

III. HO-1 mRNA 発現と HO-1 蛋白発現の相関の検討

近位尿細管上皮細胞においては、HO-1 mRNA と HO-1 蛋白の発現に明らかな相関を認めた (図4A, C, E) ($R=0.31$, $Y=1.411+0.375X$, Spearman の順位相関係数, $p<0.05$)。一方、遠位尿細管においては HO-1 mRNA 発現の程度に関わらず HO-1 蛋白発現は常に高度であり、両者の発現に明らかな相関関係は

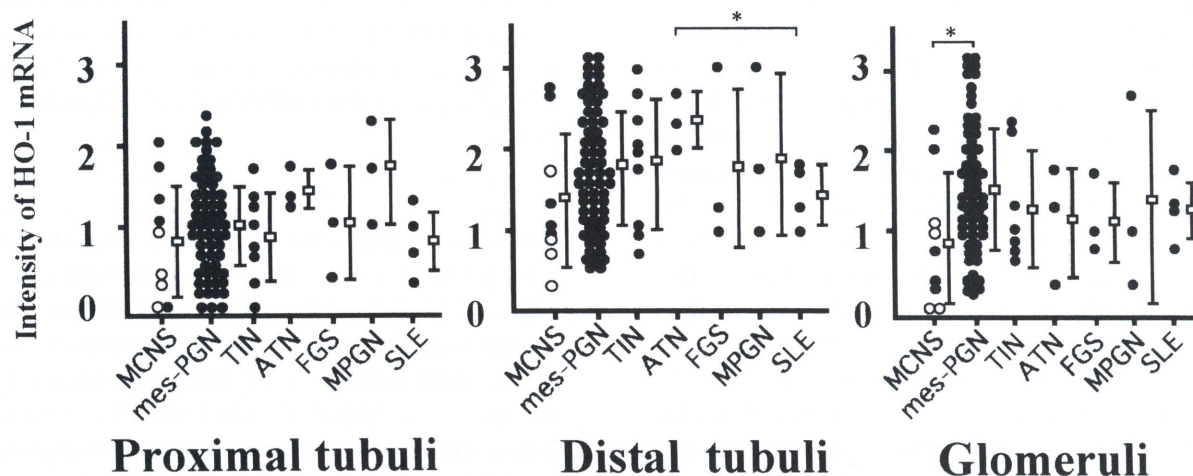


Fig. 5. Comparison of HO-1 mRNA expression in various renal diseases. The intensity of HO-1 mRNA expression was stronger in ATN as compared with SLE within distal tubuli. The intensity of HO-1 mRNA expression was stronger in Mes-PGN as compared with MCNS within glomeruli. ○, MCNS without proteinuria at the time of renal biopsy.

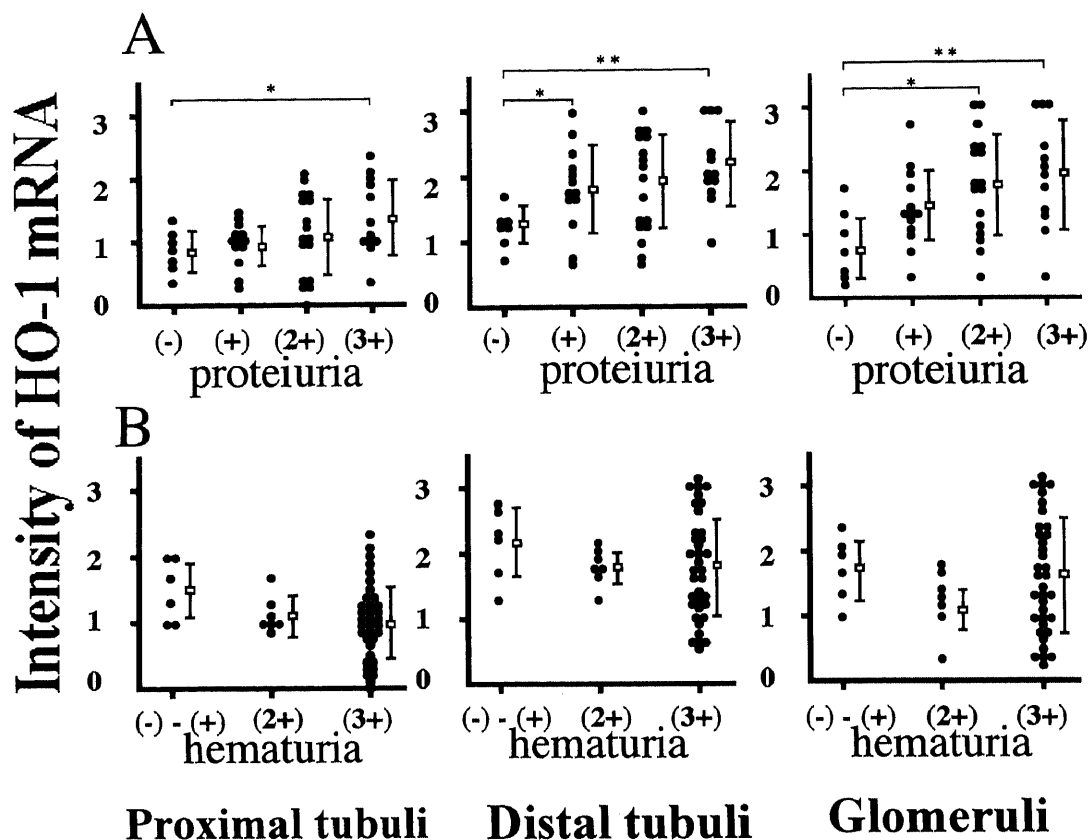


Fig. 6. Correlation between HO-1 mRNA expression and the degrees of proteinuria or hematuria. In Mes-PGN, the intensity of HO-1 mRNA expression increased as the levels of proteinuria increased (A), Mann-Whitney test, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. There was no correlation between the intensity of HO-1 mRNA expression and the degree of hematuria (B).

認められなかった。しかし全体としては、HO-1 mRNAの発現は近位尿細管に比し遠位尿細管において強い傾向が示された(図4B, D, F)。

Ⅳ. 各種腎疾患別のHO-1 mRNAの発現の検討

近位尿細管では疾患毎にHO-1 mRNA発現に差を認めなかった。遠位尿細管ではループ腎炎症例に比べ、急性尿細管壊死症例の方が(Mann-Whitney 検定, $p < 0.001$)、糸球体では微小変化型ネフローゼ症候群症例に比べ、メサングウム増殖性腎炎症例の方がHO-1 mRNA発現を強く認めたが(Mann-Whitney 検定, $p < 0.001$)、明らかな疾患特異的な差は認めなかった。興味深い所見として微小変化型ネフローゼ症候群症例のうち蛋白尿のない症例と比べ、蛋白尿を認めた症例では明らかにHO-1 mRNAの発現が強い傾向が認められた(図5)。なお、正常コントロールとして用いた、薬物療法を受けておらず、かつ完全寛解中である微小変化型ネフローゼ症候群の患者においては、HO-1 mRNAの発現は決して陰性ではなく、発現の程度は弱いものの組織中のどこかにHO-1 mRNAの発現が必ず認められた。

Ⅴ. HO-1 mRNA発現と臨床データとの関係に関する検討

最も症例数が多く検討できたメサングウム増殖性糸球体腎炎症例において、血尿、蛋白尿およびその他の各種臨床データとHO-1 mRNA発現について検討を行った。糸球体、近位尿細管、

遠位尿細管いずれの部位においても、HO-1 mRNA発現と血尿の程度との間に明らかな相関は認められなかった(図6)。一方、いずれの部位においてもHO-1 mRNA発現と蛋白尿の程度との間には明らかに有意な相関が認められた(図6)(Mann-Whitney U検定, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)。なお、年齢、性別、血圧、血清クレアチニン値、尿中NAG値、尿中 $\beta 2$ -ミクログロブリン値は、どの疾患においてもHO-1 mRNA発現強度と相関は認められなかった。

考 察

HOはヘム蛋白代謝における律速酵素で、HO-1, HO-2, HO-3の3種類が知られている。中でも誘導型のHO-1は、種々の酸化ストレスにより誘導され細胞を保護する働きがある。また、HO-1欠損症例の腎病変の主体が尿細管間質傷害であったように、尿細管上皮細胞における重要な細胞防御因子としても注目されている。今回の研究では種々の腎疾患におけるヒト腎組織でのHO-1 mRNAの発現様式を解析し、種々の臨床的データと比較検討し、その特徴や臨床的意義について検討した。

HO-1 mRNA発現は、HO-1蛋白発現を認めた近位および遠位尿細管上皮細胞だけではなく、HO-1蛋白発現の認められなかった糸球体上皮細胞とボウマン嚢上皮細胞にも認められた。糸

球体上皮細胞は、糸球体濾過装置を構成している細胞の一つであり、常に様々な酸化ストレスにさらされていることを考慮すると、糸球体上皮細胞においてHO-1 mRNA発現が認められることは予想されることである。糸球体上皮細胞におけるHO-1 mRNAの誘導のメカニズムとしては、糸球体の基底膜を濾過されて通過した尿蛋白が直接刺激となり誘導している可能性、あるいはglomerular permeability factorのような他の因子により糸球体上皮細胞が傷害されて、その結果蛋白尿を認めるようになり、さらに細胞保護のためにHO-1が誘導されるに至った可能性の2通りの機序が考えられる。

これまでの検討においては、糸球体上皮細胞やボウマン囊上皮細胞においてHO-1蛋白が検出されなかったにも関わらず、今回の研究では、これらの細胞においてHO-1 mRNA発現が確認された理由は不明である。この矛盾は、免疫組織染色と*in situ* ハイブリダイゼーション法の感度および特異度の差により生じ、今回用いた免疫組織染色の方法では糸球体上皮細胞内やボウマン囊上皮細胞内の低いレベルの発現を検出できなかった可能性が最も考えられる。しかし、もう一つの可能性として、HO-1蛋白は、糸球体上皮細胞内で産生されたあとすぐに尿細管腔へ分泌される可能性も考えられる。これを裏付けるデータとしては、近位尿細管や遠位尿細管では、HO-1蛋白発現がHO-1 mRNA発現から予想されるよりも常に強い発現を認めている事である。近位尿細管上皮細胞は、アルブミンを含む糸球体で濾過された様々な蛋白のレセプターとして機能する分子である megalin と tubulin を発現しているが³³⁾、糸球体上皮細胞から尿細管腔に分泌されたHO-1蛋白はこれらの分子を介し近位尿細管において再吸収されているのかもしれない。なお、再吸収されたHO-1蛋白が尿細管上皮細胞内で機能するかも含め、この仮説が真実であるかについては今後の検討が必要である。

遠位尿細管においては、HO-1 mRNA発現、HO-1蛋白発現とも恒常的に発現しており、その程度は近位尿細管よりも常に強かった。これはHO-1およびその分解産物が酸化ストレスから遠位尿細管細胞を保護するために発現している以外に一酸化炭素等を介して腎髄質の微小循環の維持などにも関与しているためとも考えられる³⁴⁾。

メサンギウム増殖性糸球体腎炎症例において、HO-1 mRNAは蛋白尿の程度に相関して発現が増強しており、また微小変化型ネフローゼ症候群症例においても蛋白尿のない症例に比較し、蛋白尿を認めた症例ではHO-1 mRNAの発現が強かった。これらの結果から糸球体性蛋白尿は血尿よりもHO-1の誘導に重要であり、HO-1を誘導する主要な酸化ストレス因子であると考えられた。尿蛋白の一部は蛋白自体が細胞傷害性を持つが、尿細管において蛋白が再吸収される過程において上皮細胞内では活性酸素種が産生される。最近糸球体性尿蛋白の代表であるアルブミンが尿細管上皮細胞においてインターロイキン(interleukin)-8を誘導することが報告されたが³⁵⁾、この誘導はアルブミンのエンドサイトーシスによりプロテインキナーゼCが活性化され、活性酸素種が生じ、細胞内情報伝達系が活性化され生じることが証明されている。HO-1は、糸球体および尿細管上皮細胞においてこのように尿蛋白により生じた酸化ストレスから細胞を保護していると考えられた。

尿細管間質傷害は、すべての進行性腎疾患に認められる共通の変化であり、尿細管間質傷害の程度は糸球体病変の程度よりも腎機能によく相関し³⁶⁾、また尿細管間質傷害の程度は蛋白尿

の程度に相関すると考えられている³⁷⁾。HO-1欠損症例においても、腎病変の主体は尿細管間質傷害であった¹⁸⁾。本研究ではHO-1は腎固有細胞における上皮系細胞において蛋白尿の程度に相関して発現が強く認められていたことから、HO-1は尿細管上皮細胞などの上皮系細胞にとって細胞防御機構上非常に重要な役割を担っており、尿細管間質傷害の始まりを規定し腎不全への進展を抑制する最も重要な酵素であると考えられた。

一方、HO-1蛋白発現は、近位尿細管において血尿の程度に相関していたが、HO-1 mRNA発現は糸球体上皮細胞、尿細管上皮細胞のいずれにおいても血尿の程度との相関を認めなかった。これらの結果から、血尿は蛋白尿と比較し、HO-1産生の誘導にはずっと弱い酸化ストレスであることが推測された。HO-1は、赤血球が破壊し生じたヘム蛋白により誘導されるが、破碎されない限り赤血球それ自体はHO-1を強く誘導しないのかもしれない。近位尿細管上皮細胞において、HO-1蛋白発現が血尿の程度と相関を認めたのは、糸球体上皮細胞では強い血尿を呈した例ではHO-1 mRNAが強く発現している傾向があることから、上述のごとくHO-1蛋白が糸球体上皮細胞内で産生されたあとすぐに尿細管腔へ分泌され、近位尿細管において再吸収された結果を反映しているのかもしれない。もちろんHO-1 mRNAとHO-1蛋白の発現や消失における時間差や総量などは各細胞によって違っており³²⁾、この違いがこのような結果の相違につながった可能性もある。

なお、正常コントロールとして用いた、薬物療法を受けておらずかつ完全寛解期にある微小変化型ネフローゼ症候群患者の腎組織において、弱いながらも腎組織中のどこかにHO-1 mRNAの発現が必ず認められたという事実は非常に面白い現象であった。腎臓は、体内の老廃物を排泄する臓器である事を考えれば、健康人であっても常に何らかの老廃物が糸球体を濾過されて排出されており、糸球体や尿細管の上皮系細胞は、この老廃物に常に曝されている事になる。つまり、これらの上皮系細胞は、常時何らかの酸化ストレスに曝されており、そしてその結果、細胞保護のためにHO-1が誘導されているものと考えられた。

以上の結果から、HO-1はネフロン各部位それぞれで発現が調節され、酸化ストレスの原因となる蛋白尿から上皮細胞を保護するとともに、それぞれの部位で異なる働きをしており腎機能の維持に重要な役割を果たしていると考えられた。そしてHO-1は、糸球体および尿細管上皮細胞にとって細胞防御機構上非常に重要な酵素であり、進行性腎機能障害の病態解明、進行予防、治療戦略を考える上で重要な示唆を与える酵素であるとも考えられた。

結 論

種々の腎疾患におけるヒト腎組織での*in vivo*でのHO-1 mRNAの発現様式を解析し、臨床的なデータと比較検討した結果以下の所見を得た。

1. HO-1 mRNAの発現は、糸球体上皮細胞、ボウマン囊上皮細胞、尿細管上皮細胞などの腎固有細胞、および間質に浸潤するマクロファージに認められた。
2. HO-1 mRNAは、尿細管では近位側より遠位側で常に強く発現していた。
3. 近位尿細管ではHO-1 mRNAとHO-1蛋白の発現に相関を認めた。遠位尿細管ではHO-1 mRNAの発現はHO-1蛋白の発

現の強さに関わらず一定の強さで強く発現しており、両者の発現には明らかな相関を認めなかった。

4. HO-1 mRNAの発現には、疾患特異性は認めなかった。
5. HO-1 mRNAの発現強度は、近位・遠位尿細管上皮細胞、糸球体上皮細胞ともに蛋白尿の強さの程度と相関を認めた。
6. これらの結果からHO-1はネフロンの各部位それぞれで発現が調節され、酸化ストレスの原因となる蛋白尿から上皮細胞を保護するとともに、それぞれの部位で異なる働きを行い、腎機能の維持に重要な役割を果たしていると思われた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました金沢大学大学院医学系研究科循環医学専攻血管発生発達病態学分野 小泉晶一教授に深甚なる謝意を表します。また本研究を直接御指導、御教示賜りました金沢大学血管発生発達病態学分野 太田和秀講師に心から謝意を表します。また、本研究の遂行に際して御助言、御協力をいただきました金沢大学血管発生発達病態学分野 犀川太講師および金沢大学医学部保健学科医学臨床検査講座 谷内江昭宏教授に厚く御礼を申し上げます。また血管発生発達病態学分野の皆様にも心から感謝申し上げます。なお、本論文の要旨の一部は第39回日本小児腎臓病学会学術集会(2004年、熊本)において発表した。

文 献

- 1) Maines MD. New developments in the regulation of heme metabolism and their implication. *CRC Crit Rev Toxicol* 12: 241-314, 1984
- 2) Maines MD. Heme oxygenase-1: Function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *FASEB J* 2: 2557-2568, 1998
- 3) Choi AMK, Alam J. Heme oxygenase-1: Function, regulation, and implication of a novel stress-inducible protein in oxidant-induced lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 15: 9-19, 1996
- 4) Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN, Ames BN. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* 235: 1043-1046, 1987
- 5) Nakagami T, Toyomura K, Kinoshita T, Morisawa S. A beneficial role of bile pigments as an endogenous tissue protector: Anti-complement effects of biliverdin and conjugated bilirubin. *Biochem Biophys Acta* 1158: 189-193, 1993
- 6) Ingi T, Cheng J, Ronnet GV. Carbon monoxide: An endogenous modulator of the nitric oxide-cyclic GMP signaling system. *Neuron* 16: 835-842, 1996
- 7) Seki T, Naruse M, Naruse K, Yoshimoto T, Tanabe A, Tsuchiya K, Hirose S, Imaki T, Nihei H, Demura H. Roles of heme oxygenase/carbon monoxide system in genetically hypertensive rats. *Biochem Biophys Res Commun* 241: 574-578, 1998
- 8) Juckett MB, Balla J, Jessurun J, Jacob HS, Vercellotti GM. Ferritin protects endothelial cells from oxidized low density lipoprotein in vivo. *Am J Pathol* 147: 782-789, 1995
- 9) Balla G, Jacob HS, Balla J, Rosenberg M, Nath K, Apple F, Eaton JW, Vercellotti GM. Ferritin; A cytoprotective antioxidant stratagem of endothelium. *J Biol Chem* 267: 1814-1815, 1992
- 10) Berglund L, Galbraith RA, Emtestam L, Drummond GS, Angelin B, Kappas A. Heme oxygenase inhibitors transiently increase serum ferritin concentration without altering other acute-phase reactants in man. *Pharmacology* 59: 51-56, 1999
- 11) McCoubrey WK, Huang TJ, Maines MD. Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes heme protein, heme oxygenase-3. *Eur J Biochem* 247: 725-732, 1997
- 12) Stocker R. Induction of heme oxygenase as a defense against oxidative stress. *Free Radical Res Commun* 9: 101-112, 1990
- 13) Keyes SM, Tyrrell RM. Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in skin fibroblasts by UVA radiation hydrogen peroxide and sodium arsenite. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 99-103, 1989
- 14) Wagner CT, Durate W, Christodoulides N, Hellums JD, Schafer AI. Hemodynamic forces induce the expression of heme oxygenase in cultured vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 100: 589-596, 1997
- 15) Agarwal A, Shiraishi F, Visner GA, Nick HS. Linoleyl hydroperoxide transcriptionally upregulates heme oxygenase-1 gene expression in human renal epithelial and aortic endothelial cells. *J Am Soc Nephrol* 9: 1990-1997, 1998
- 16) Baliga R, Zhang Z, Baliga M, Ueda N, Shah SV. In vitro and in vivo evidence suggesting a role for iron in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Kidney Int* 53: 394-401, 1998
- 17) Yachie A, Niida Y, Wada T, Igarashi N, Kaneda H, Toma T, Ohta K, Kasahara Y, Koizumi S. Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency. *J Clin Invest* 103: 129-135, 1999
- 18) Ohta K, Yachie A, Fujimoto K, Kaneda H, Wada T, Toma T, Seno A, Kasahara Y, Yokoyama H, Seki H, Koizumi S. Tubular injury as a cardinal pathologic feature in human heme oxygenase-1 deficiency. *Am J Kidney Dis* 35: 868-870, 2000
- 19) Morimoto K, Ohta K, Yachie A, Yang Y, Shimizu M, Goto C, Toma T, Kasahara Y, Yokoyama H, Miyata T, Seki H, Koizumi S. Cytoprotective role of heme oxygenase (HO)-1 in human kidney with various renal diseases. *Kidney Int* 60: 1858-1866, 2001
- 20) Nath KA, Balla G, Vercellotti GM, Balla J, Jacob HS, Levitt MD, Rosenberg ME. Induction of heme oxygenase is a rapid, protective response in rhabdomyolysis in the rat. *J Clin Invest* 90: 267-270, 1992
- 21) Mosley K, Wembridge DE, Cattel V, Cook HT. Heme oxygenase is induced in nephrotoxic nephritis and hemin, a stimulator of heme oxygenase synthesis, ameliorates disease. *Kidney Int* 53: 672-678, 1998
- 22) Ishizuka S, Nagashima Y, Nimata M, Yana T, Hagiwara K, Ozasa H, Sone M, Nihei H, Horikawa S. Regulation and immunohistochemical analysis of stress protein heme oxygenase-1 in rat kidney with myoglobinuric acute renal failure. *Biochem Biophys Res Commun* 240: 93-98, 1997
- 23) Vogt BA, Alam J, Croatt AJ, Vercellotti GM, Nath KA. Acquired resistance to acute oxidative stress: Possible role of heme oxygenase and ferritin. *Lab Invest* 72: 474-483, 1995
- 24) Agarwal A, Balla J, Alam J, Croatt AJ, Nath KA. Induction of heme oxygenase in toxic renal injury: A protective role in

- cisplatin nephrotoxicity in the rat. *Kidney Int* 48: 1298-1307, 1995
- 25) Nath KA, Croatt AJ, Likely S, Behrens TW, Warden D. Renal oxidant injury and oxidant response induced by mercury. *Kidney Int* 50: 1032-1043, 1996
- 26) Vogt BA, Shanley TP, Croatt AJ, Alam J, Johnson KJ, Nath KA. Glomerular inflammation induces resistance to tubular injury in the rat. *J Clin Invest* 98: 2139-2145, 1996
- 27) Horikawa S, Ito K, Ikeda S, Shibata T, Ishizuka S, Yana T, Hagiwara K, Ozasa H, Katsuyama I. Induction of heme oxygenase-1 in toxic renal injury: Mercuric chloride-induced acute renal failure in rat. *Toxicol Lett* 94: 57-64, 1998
- 28) Tetsuka T, Daphna-Iken D, Srivastava SK, Morrison AR. Regulation of heme oxygenase mRNA in mesangial cells: Prostaglandin E2 negatively modulates interleukin-1 induced heme oxygenase-1 mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 212: 617-623, 1995
- 29) Datta PK & Lianos EA. Nitric oxide induces heme oxygenase-1 gene expression in mesangial cells. *Kidney Int* 55: 1734-1739, 1999
- 30) Berger SP, Hunger M, Yard BA, Schnuelle P, Woude FJ. Dopamin induced the expression of heme oxygenase-1 by human endothelial cells in vitro. *Kidney Int* 58: 2314-2319, 2000
- 31) Bek MJ, Wahle S, Muller B, Benzing T, Huber TB, Kretzler M, Cohen C, Buuse-Grawitz A, Pavenstadt H. Stra13, a prostaglandin E2-induced gene, regulates the cellular redox state of podocytes. *FASEB J* 17: 682-684, 2003
- 32) Yang Y, Ohta K, Shimizu M, Morimoto K, Goto C, Nakai A, Toma T, Kasahara Y, Yachie A, Seki H, Koizumi S. Selective protection of renal tubular epithelial cells by heme oxygenase (HO)-1 during stress-induced injury. *Kidney Int* 64: 1302-1309, 2003;
- 33) Christensen EI & Birn H. Megalin and cubilin: synergistic endocytic receptors in renal proximal tubule. *Am J Physiol Renal Physiol* 280: F562-F573, 2001
- 34) Zou AP, Billington H, Su N, Cowley AW Jr. Expression and actions of heme oxygenase in the renal medulla of rats. *Hypertension* 35: 342-347, 2000
- 35) Tang S, Leung JCK, Abe K, Chan KW, Chan LYY, Chan TK, Lai KN. Albumin stimulates interleukin-8 expression in proximal tubular epithelial cells in vitro and in vivo. *J Clin Invest* 111: 515-527, 2003
- 36) Nath KA. Tubulointerstitial changes as a major determinant in the progression of renal damage. *Am J Kidney Dis* 1: 1-17, 1992
- 37) Benigni A, Zoja C, Remuzzi G. The renal toxicity of sustained glomerular protein traffic. *Lab. Invest* 73: 461-468, 1995

Segment patterns of HO-1 gene expression within human kidney and its clinical significance Masaki Shimizu, Department of Pediatrics, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — *J. Jusen Med Soc.*, **113**, 117 — 125 (2004)

Key words heme oxygenase-1, mRNA, in situ hybridization, oxidative stress, proteinuria

Abstract

Heme oxygenase-1 (HO-1) functions as a rate limiting enzyme in heme degradation and is induced upon stimulation with various oxidative stresses. The salient feature of the renal pathology of the HO-1 deficient case was advanced tubulointestinal injury and it has been suggested that HO-1 is an important protective factor for renal tubular epithelial cells. In this study, we examined HO-1 mRNA expression within human kidney in various renal diseases and compared the data with the patterns of HO-1 protein expression. The results were further analyzed by comparing the levels of HO-1 gene expression with various clinical parameters to see the value of its examination. Included in this study were 9 cases of minimal-change nephrotic syndrome (MCNS), 63 cases of mesangial proliferative glomerulonephritis [Mes-PGN; IgA nephropathy, purpura nephritis and non-IgA nephropathy], 9 cases of tubulointerstitial nephritis (TIN), 3 cases of acute tubular necrosis (ATN), 3 cases of focal segmental glomerulosclerosis (FSGS), 4 cases of systemic lupus erythematosus (SLE) and 3 cases of membranous proliferative glomerulonephritis (MPGN) and a case of HO-1 deficiency. HO-1 mRNA expression of human kidney specimen was examined by in situ hybridization. HO-1 mRNA was detectable within glomerular epithelial cells, Bowman's epithelial cells, tubular epithelial cells, and infiltrating macrophages. In tubular epithelial cells, HO-1 mRNA expression tended to be more intense within distal tubuli than proximal tubuli. There was the significant positive correlation between the levels of HO-1 protein and mRNA expressions within the proximal tubuli. In contrast, there was no correlation between the levels of HO-1 protein and mRNA expressions within the distal tubuli, where HO-1 mRNA expression was constantly high regardless the levels of HO-1 protein expression. There was no disease-specific pattern of HO-1 mRNA expression for any of these illnesses. HO-1 mRNA expression within tubular epithelial cells and glomerular epithelial cells tended to be more intense with greater degrees of proteinuria. These data suggest that HO-1 protects renal epithelial cells from oxidative injury caused by glomerular proteinuria that impairs renal function, and at the same time, may help to preserve the functions of nephrons. Collectively, HO-1 is an enzyme playing unique roles in different segments of nephrons to maintain the integrity of the renal function.